

Essai d'Application de la Réaction d'Agglutination des Particules de Collodion à quelques Parasitoses

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 10 NOVEMBRE 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

COLY Marc

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Certifié de Parasitologie

Né le 29 Mars 1930 à SAINT-GEORGES-ès-ALLIER (Puy-de-Dôme)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
CAMILLE ANNEQUIN, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

1955

ESSAI D'APPLICATION
DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION
DES PARTICULES DE COLLODION
A QUELQUES PARASITOSES

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen Honoraire.....	MM. J. LEPINE
Doyen	H. HERMANN
Assesseur	J. GATE

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, COLLET, CLUZET, BERARD, GUIART, PIERY, CADE, PATEL, LEPINE, SAVY, TRILLAT, LERICHE, MOURIQUAND, MAZEL, LEULIER, GARIN

PROFESSEURS

Clinique médicale A.....	MM. FROMENT
Clinique médicale B.....	P. RAVAUULT
Clinique chirurgicale A.....	SANTY
Clinique chirurgicale B.....	WERTHEIMER
Clinique ophtalmologique	BONNET
Clinique urologique	CIBERT
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.....	DUFOURT
Clinique dermatologique et syphiligraphique.....	GATE
Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale.....	DECHAUME
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie.....	SEDALLIAN
Clinique de chirurgie orthopédique et chirurgie infantile.....	GUILLEMINET
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Clinique stomatologique	DUCLOS
Clinique médicale infantile et Hygiène premier âge.....	BERNHEIM
Clinique oto-rhino-laryngologie	MAYOUX
Physiologie	HERMANN
Anatomie pathologique.....	J.-F. MARTIN
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	PONTHUS dét. à Beyrouth
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.....	ROCHET
Chimie organique et Toxicologie.....	CHAMBON
Pathologie générale et expérimentale.....	JOSSEAND
Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale.....	DELORE
Anatomie	GABRIELLE
Pathologie interne.....	CROIZAT
Chimie biologique et médicale.....	ENSELME
Pathologie chirurgicale.....	MALLET-GUY
Histologie	NOEL
Pharmacie galénique et matière médicale.....	REVOL
Médecine du Travail.....	BOURRET
Thérapeutique	LEVRAT
Hygiène et Action sanitaire et sociale.....	SOHIER
Biologie médicale et pharmacodynamie.....	JOURDAN
Botanique et cryptogamie.....	NETTEN
Propédeutique chirurgicale	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique.....	BADINAND
Pharmacie et Pharmacologie.....	DREVON
Médecine légale et déontologie.....	ROCHE
Parasitologie et Pathologie exotique.....	X...

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique	MM. BANSSILLON
Physique biologique.....	BERGER

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Parasitologie	MM. ROMAN	Ph. galén. et mat. méd.	MM. DORCHE
Parasitologie	COUDERT	Anatomie	DUROUX
Physiologie	J.-F. CIER	Pharm. et pharmacolog.	A. CIER
Physiologie	CHATONNET	Hygiène	BENAZET
Chimie biol. et médic.	R. CREYSEL	Anatomie pathologique.	FEROLDI
Bactériologie	A. BERTOYE	Chim. organ. et toxicol.	PERROT

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Pathologie médicale....	MM. GALY	Ophtalmologie	MM. PAUFIQUE
Pathologie médicale....	GONIN	Obstétrique	MAGNIN
Pathologie médicale....	GUINET	Obstétrique	J. MATHIEU
Pathologie médicale....	PONT	Obstétrique	BURTHIAULT
Pathologie médicale....	VIGNON	Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX
Pathologie médicale....	REVOL	Dermato-vénérologie ..	THIERS
Pathologie médicale....	TRAEGER	Urologie	PERRIN
Pathologie chirurgicale....	MANSUY	Neuro-chirurgie	LECURIE
Pathologie chirurgicale....	DARGENT	Orthopédie	J. MARION
Pathologie chirurgicale....	GUILLET	Stomatologie	FREIDEL
Pathologie chirurgicale....	P. MARION	Electro-radiologie	PAPILLON
Pathologie chirurgicale....	MICHAUD	Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS
Pathologie chirurgicale....	JAUBERT de BEAUJEU	Thérapeutique	X...
Pathologie chirurgicale....	SAUTOT	Maladies infectieuses....	X...

CHARGÉ DES FONCTIONS D'AGRÉGÉ

Médecine légale.....	M. COLIN
----------------------	----------

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Histologie	MM. L. DUMONT
Physique biologique.....	MORET

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. GARIN, Président ; COUDERT, BERTOYE, BENAZET, Assesseurs.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

Essai d'Application de la Réaction d'Agglutination des Particules de Collodion à quelques Parasitoses

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 10 NOVEMBRE 1955

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

COLY Marc

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Certifié de Parasitologie

Né le 29 Mars, 1930 à SAINT-GEORGES-ès-ALLIER (Puy-de-Dôme)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
CAMILLE ANNEQUIN, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

—
1955



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

Je lui dois tout.

Qu'elle trouve ici le témoignage de mon affection et de ma reconnaissance.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur Ch. GARIN

Chevalier de la Légion d'Honneur
Professeur de Parasitologie à la Faculté de Médecine
de Lyon

Il nous fait le grand honneur de présider notre Jury de Thèse. Nous le remercions de la bienveillance avec laquelle il nous a reçu au laboratoire de Parasitologie.

Qu'il nous soit permis de lui dire en même temps que notre gratitude, notre respectueuse admiration.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Agrégé J. COUDERT

Professeur Agrégé de Parasitologie à la Faculté de Médecine
de Lyon

Il nous a inspiré cette thèse. Pendant les trois années que nous avons passées au laboratoire de Parasitologie il nous a prodigué ses conseils et ses encouragements. Qu'il trouve ici l'hommage de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé A. BERTOYE

Il a accepté de siéger parmi nos juges. Nous le remercions ici du grand honneur qu'il nous fait et l'assurons de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Agrégé F. BENAZET

Spécialiste des Hôpitaux Militaires

Il est pour nous un exemple.

C'est pour nous un agréable devoir de le remercier ici de l'intérêt qu'il porte à ce travail.

A Monsieur le Médecin-Lieutenant-Colonel BARBIER

Chevalier de la Légion d'Honneur
Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Médecin-Chef du Service O.R.L.
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

Nous avons été très heureux d'être interne
dans son service.

Il a été pour nous un maître plein de bonté
et par ses conseils riches d'enseignements il nous
a appris à aimer sa spécialité.

Qu'il veuille trouver ici le témoignage de
notre gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Médecin-Général GIRAUD

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A NOS MAITRES

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

DES HOPITAUX CIVILS, DE L'HOPITAL DESGENETTES

ET DES E.M.P. DE BILLOM ET D'AUTUN

En présentant ce travail, nous voulons remercier tous ceux qui, au laboratoire de Parasitologie, nous ont aidé dans sa réalisation : le Docteur J.P. Garin qui nous a accueilli au laboratoire, nous a appris à travailler et a toujours su nous faire partager son enthousiasme ; Mme Simon, qui avec patience et dévouement, nous a fait profiter de sa grande expérience du travail de laboratoire ; notre camarade Ch. Douchet enfin qui a participé à nos recherches.

INTRODUCTION

Au début de l'année 1954, M. le Professeur Coudert nous a proposé d'appliquer au diagnostic de quelques maladies parasitaires la technique de l'agglutination des particules de collodion, préparées selon la méthode décrite par Cavelti (8). Au cours du travail qui a suivi nous avons pu tester ainsi un certain nombre de sérums de malades atteints de diverses maladies parasitaires, ainsi que des sérums d'animaux de laboratoire (rats, cobayes) présentant des maladies expérimentales.

Cette méthode nous a, en outre, permis de faire des titrages d'antigènes parasitaires utilisés de façon courante dans d'autres réactions immunologiques et principalement pour des intra-dermo-réactions (antigènes ascaridien et distomien par exemple).

Dans cette thèse, nous nous proposons d'indiquer tout d'abord les techniques utilisées puis, dans une seconde partie, les résultats que nous avons obtenus. Il reste évident que le faible nombre de sérums testés nous interdit de donner à ces résultats une valeur statistique permettant d'affirmer ou d'infirmer la valeur de cette réaction immunologique pour le diagnostic des maladies parasitaires. Nous avons simplement voulu donner ici des indications générales qui, nous l'espérons, seront utiles pour la réalisation de travaux plus poussés dans cette voie.

HISTORIQUE

Depuis de nombreuses années des « facteurs adjuvants » sont utilisés dans la réaction antigène-anticorps ; ils ont pour but de permettre l'observation de l'union de l'antigène avec l'anticorps si celle-ci n'est pas directement apparente, ou de raccourcir les délais de cette observation en augmentant la vitesse de la réaction spécifique.

Un de ces facteurs adjuvants, est l'utilisation des particules inertes dont l'action repose sur l'observation suivante (Neuzil, 31) : au cours de la réaction de floculation spécifique, on observe l'édification d'un complexe dont les dimensions augmentent progressivement par suite de l'incorporation continuelle de molécules nouvelles d'antigène et d'anticorps. L'affinité du complexe pour le milieu aqueux au sein duquel il se forme, provient des groupements hydrophiles des molécules des deux réactifs immunologiques. Les groupements hydrophiles des molécules situées à l'intérieur du complexe sont masqués, et seuls ceux qui appartiennent aux molécules situées à la surface peuvent maintenir le complexe en solution. Pour une taille suffisante de ce dernier, le nombre des groupements hydrophiles superficiels devient insuffisant et l'on observe le phénomène de floculation.

Depuis longtemps, divers auteurs ont pensé que l'utilisation des particules inertes, sur lesquelles on aurait préalablement absorbé l'antigène ou l'anticorps, devrait augmenter la sensibilité de la réaction *in vitro* en fournissant au complexe un noyau central insoluble. Il en est effectivement ainsi et la réaction immunologique devient alors une réaction d'agglutination spécifique d'éléments figurés, d'observation facile.

Jones (24, 25), reprenant les travaux de Nicolle, de Kraus et Von Pirquet, montre qu'un sérum chauffé à température élevée

donne des réactions plus nettes, par l'adjonction de la précipitine correspondante, qu'un sérum non chauffé ; il l'explique par le fait qu'une partie de la protéine chauffée est coagulée et se recouvre d'un film de protéine non dénaturée, restant en solution et pouvant s'agglutiner par l'adjonction d'un anticorps.

Loeb (27) ayant montré que les particules de collodion sensibilisées par un antigène se recouvrent d'un film de cet antigène, Jones utilisa des particules de collodion ainsi que des hématies comme support d'antigène.

Zozaya (39) montra ensuite que des polysaccharides absorbés sur un support colloïde et principalement sur des particules de collodion peuvent acquérir des propriétés antigéniques.

Des particules inertes de nature très différente furent alors essayées : bactéries ; hématies, particules de cholestérol et de collodion... et d'autres qui n'ont pu être retenues, mais les particules de collodion ont donné des résultats très intéressants.

Il se posait alors le problème de la préparation d'une suspension de particules de collodion stable et homogène. Loeb (27), le premier, montra que la stabilité de la suspension est fonction du potentiel électrique existant entre les particules de collodion et le liquide au sein duquel elles se trouvent ; Bedson (1) et Mudd (30) arrivèrent à des conclusions identiques. Loeb ayant mis au point la première méthode de préparation des particules de collodion, ses travaux furent repris par Freund qui utilise les particules de collodion comme support de toxine ou d'antitoxine.

Cannon et Marshall (5, 6), ainsi que Goodner (21), utilisent l'agglutination des particules de collodion, en regard d'autres réactions sérologiques, pour titrer les anticorps dans des sérums d'animaux inoculés avec différentes souches bactériennes :

Eisler (13), utilisant différents antigènes bactériens, montre que la concentration optimale des particules de collodion varie selon les antigènes utilisés.

Divers auteurs ont alors appliqué cette méthode d'agglutination à des sérums d'homme et d'animaux présentant des affections variées :

Tuberculose : Weir ; Riordan ; Morris.

Syphilis : Berger.

Infection à pneumocoque : Burger.

La plupart de ces auteurs se montrèrent satisfaits de leurs résultats et constatèrent que souvent le titre de positivité était beaucoup plus élevé qu'avec d'autres méthodes sérologiques.

Puis Cavelti (8) améliora la technique de préparation des particules de collodion, donnant surtout des notions nettes sur la concentration de la suspension et sur la technique de la réaction d'agglutination.

Saslaw et Campbell ont obtenu des résultats intéressants en utilisant des particules ainsi préparées, pour la recherche et le titrage d'anticorps dans des sérums d'hommes et d'animaux atteints d'histoplasmoses. Havens et Eichman ont également employé cette réaction sérologique dans l'étude des hépatites virales.

La plupart des auteurs ayant utilisé l'agglutination des particules de collodion se sont montrés satisfaits et ont insisté sur la simplicité de la réaction ainsi que sur sa grande spécificité.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER

PRÉPARATION DES PARTICULES DE COLLODION

La méthode de préparation décrite ici est celle de Cavelti :
« Du collodion dissous dans de l'alcool-éther est versé lentement dans une capsule de 2 litres contenant environ 1,5 litre d'eau distillée (de préférence tri-distillée) dans laquelle il est agité avec une baguette de verre. La masse de collodion est rassemblée avec ladite baguette. On change plusieurs fois l'eau pour 500 cc. de collodion. La masse de collodion séparée est ainsi lavée plusieurs fois à l'eau tridistillée en la remuant et en la pressant jusqu'à ce qu'elle devienne dure et résistante. L'eau est éliminée et la masse est desséchée sous vide dans un dessiccateur à acide sulfurique et soude qui sont renouvelés plusieurs fois pendant plusieurs jours jusqu'à ce que le matériel soit desséché et que l'odeur d'éther ait totalement disparu.

Pour la préparation des particules de collodion, l'appareillage suivant est monté : une canule de verre avec une extrémité capil-

laire courbée vers le bas est branchée sur l'ajutage latéral d'un flacon à vide de 250 cc., et fixée dans l'ajutage par une manche en caoutchouc. Un tube de caoutchouc relie l'extrémité extérieure de la canule à une bouteille à injection graduée, suspendue en position surélevée, contenant 500 à 1.000 cc. d'un mélange de 3 parties d'eau tridistillée et d'une partie d'acétone. Une baguette de verre en forme de L, montée sur le raccord d'un moteur électrique à vitesse variable, est introduite par en-dessus, dans le flacon à vide. Pour prévenir la chute d'huile et de poussières du moteur dans le flacon, un disque de caoutchouc de 6 millimètres de diamètre est placé sur la baguette juste au-dessus du col du flacon. Moteur et flacon sont disposés sur un statif de laboratoire de façon à ce que le flacon soit immergé, dans sa moitié inférieure, dans un bain d'eau à température constante de 40° C.

A partir du collodion desséché on prépare 100 cc. de solution à 10 % dans l'acétone sous agitation, à 40° C. Après complète dissolution du collodion, la vitesse de l'agitation est fixée à 800 tours/minute et, sous agitation, environ 50 cc. du mélange eau-acétone sont envoyés, sous forme d'un fin courant par le tube capillaire, dans le flacon contenant le collodion en suspension dans l'acétone.

La solution de collodion devient trouble sous l'effet de la séparation des particules. On arrête alors l'agitation et l'excès de collodion se dépose en masse au fond du flacon. Le trouble surnageant est enlevé à la pipette et le résidu du collodion est redissous dans l'acétone et de nouveau précipité sous agitation, par addition du mélange eau-acétone. Ce procédé est répété 10 à 12 fois, ou jusqu'à ce que la plus grande partie du collodion soit épuisée. Chaque fois, le volume de l'acétone employée pour la redissolution du collodion est diminué d'environ 5 % ; le mélange eau-acétone, ajouté chaque fois par la précipitation, doit aussi être diminué en proportion. Ce qui surnage des trois premières précipitations est rejeté à cause de la tendance de ces particules à des réactions non spécifiques. Les surnageants des 7 à 9 précipitations suivantes sont versés, immédiatement après chaque précipitation, à travers un filtre de gaze, dans un flacon contenant 600 cc. d'eau distillée froide. Une suspension laiteuse en résulte. Lorsque la récolte est complète, le flacon est placé

dans un bain d'eau à environ 28° C. et de l'air est envoyé vigoureusement en barbotage à travers la suspension, pour éliminer l'acétone. Cela demande trois à cinq jours, et la manœuvre est continuée pendant 24 heures après que l'odeur d'acétone ait disparu complètement.

Après extraction de l'acétone, les particules sont lavées trois fois à l'eau tridistillée de la façon suivante : la suspension est d'abord filtrée à travers plusieurs épaisseurs de gaze pour éliminer les gros amas. Elle est ensuite centrifugée à 2.500 t/m pendant 5 minutes ; le surnageant est centrifugé à la même vitesse pendant une heure et le surnageant de cette nouvelle centrifugation est rejeté. Les deux culots sont remis en suspension dans une moindre quantité d'eau tridistillée, au moyen d'un agitateur à baguette de verre relié au moteur électrique. (Veiller à ce que l'agitateur ne touche pas le sédiment.) Les particules réunies, remises en suspension, sont encore centrifugées à 2.500 t/m pendant 5 minutes et le surnageant pendant une heure. Ce processus est ainsi renouvelé trois à quatre fois, et la quatrième suspension des particules se fait nettement concentrée.

Les plus grosses particules sont alors éliminées par une centrifugation de 3 minutes à 2.500 t/m. Le liquide surnageant est recueilli et le culot, remis en suspension dans une quantité moindre de liquide, est encore une fois centrifugé 3 minutes à 2.500 t/m de façon à recueillir le plus grand nombre possible de petites particules. Les deux derniers liquides surnageants sont recueillis et le sédiment ultime est rejeté.

La suspension de collodion est ajustée en densité de façon à réaliser le N° 2 de l'échelle de Mac Farland, quand elle est diluée au 1/20. (N° 2 de l'échelle de Mac Farland : 2 cc. de solution à 1 % de chlorure de baryum + 98 cc. d'acide sulfurique à 1 %.)

On place alors la solution-stock de collodion ainsi obtenue dans un flacon en pyrex, à température ambiante, dans un endroit obscur. L'examen microscopique de la suspension montre que les particules ont un diamètre variant depuis la limite de visibilité jusqu'à 4 à 5 microns.

Le collodion qui nous a donné les meilleurs résultats sérologiques et les suspensions les plus stables est le :

Collodion à l'éther en solution à 40 gr/litre de la Maison Gifrer & Barbezat.

NOTA. — 1° La dessiccation du collodion lavé, dans un dessiccateur à acide sulfurique et soude, selon la méthode décrite par Cavelti, peut être remplacée par une dessiccation à l'étuve à 37° C. pendant deux jours puis à l'étuve à 60° C. pendant quatre ou cinq jours.

2° Le barbotage de la suspension à l'air libre pendant 8 jours, pour en chasser les dernières vapeurs d'éther et d'acétone, est avantageusement remplacé par un barbotage de 48 heures avec aspiration par trompe à vide ; c'est ainsi que nous procédons au laboratoire de Parasitologie pour préparer nos suspensions-stocks.

3° Pour des raisons de solidité nous avons dû modifier la forme de l'agitateur en verre fixé sur le moteur ; au lieu de lui conserver sa forme en L, nous lui avons donné une forme en crochet équilibré statiquement.

Concentration de la suspension.

Les essais d'agglutination réalisés avec la première suspension de particules que nous avons faite, ne nous ont pas donné satisfaction ; en fait nous ne pouvions pas obtenir d'agglutinations. Cependant, examinée au microscope, cette suspension était bien homogène et les particules, dont la taille variait de 0,5 à 3 ou 4 microns, étaient agitées de mouvements browniens, ce qui nous assurait que la suspension était bien à l'état colloïdal. En outre, les autres constituants de la réaction nous semblaient présenter toutes garanties :

— Antigènes lyophilisés donc en parfait état de conservation, ou antigène liquide toxoplasmique utilisé de façon courante au laboratoire et donnant toute satisfaction.

— Sérums de malades ou d'animaux de laboratoire fortement parasités depuis plusieurs semaines, donc devant, en principe, contenir des anticorps.

Nous avons pensé que nous avions mal interprété le chapitre de la préparation relatif à la concentration de la suspension-stock. Nous avons admis que la densité optique correspondant au N° 2 de l'échelle de Mac Farland devait se comprendre comme **densité**

finale (tous les constituants de la réaction étant en contact), et non pas comme la densité optique initiale de la suspension-stock.

En effet, les particules de collodion n'intervenant pas comme constituant biologique de la réaction d'agglutination mais comme support absorbant l'antigène, on peut supposer qu'un nombre minimum de ces particules est nécessaire pour que la réaction puisse avoir lieu. Il nous a semblé justement que la concentration des particules, au cours de nos premiers essais, était insuffisante pour donner lieu à une agglutination (ou tout au moins à une agglutination visible à l'œil nu). Nous avons fait de nouveaux essais en concentrant la suspension de particules de collodion de manière à obtenir **en fin de réaction**, une densité optique correspondant au N° 2 de l'échelle de Mac Farland. Pour cela nous avons, par centrifugations, concentré trois fois plus notre suspension-stock puisque celle-ci représente, dans la réaction d'agglutination, environ le tiers du volume total des constituants.

Après cette légère modification nous avons pu obtenir des agglutinations bien lisibles à l'œil nu dans les conditions d'expérience décrites par Cavelti.

Conservation de la suspension.

La suspension de particules de collodion, préparée et ajustée en concentration de la manière décrite ci-dessus, peut en principe se conserver stable pendant six mois à la température du laboratoire si toutefois elle est placée à l'abri de la lumière. Nous avons remarqué que, dans ces conditions, la suspension se sédimente assez rapidement. Examiné au microscope, le liquide surnageant, relativement limpide, contient encore des particules mais en nombre restreint ; le sédiment est au contraire formé d'un très grand nombre de particules et celles-ci ne présentent aucune tendance à l'agglutination spontanée : en effet, si on agite le contenant le sédiment se remet en suspension et celle-ci reprend son aspect initial. Nous ne tenons donc pas compte de cette sédimentation dans l'appréciation du vieillissement de la suspension.

Par contre, nous avons observé, après trois ou quatre mois de conservation, pour nos différentes suspensions successives, que les

particules de collodion ont une nette tendance à l'agglutination spontanée ou plus exactement à s'agglutiner dès la mise en contact avec un des constituants de la réaction (antigène ou sérum à tester). En outre, l'examen microscopique de la suspension à ce moment montre la disparition presque totale des mouvements browniens.

Cette disparition de l'état colloïdal nous semble donc un test de vieillissement de la suspension et nous avons admis qu'après trois mois de conservation, la suspension ne peut plus être considérée comme stable.

CHAPITRE II

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES

Pour pratiquer nos réactions d'agglutination, nous avons utilisé le plus souvent possible des antigènes lyophilisés, mais aussi quelquefois des antigènes liquides préparés au laboratoire.

1. Les **antigènes lyophilisés** que nous avons utilisés ont été préparés à partir des parasites suivants :

- Grande Douve (isolée à partir de foie de bovidés).
- Tænia saginata*.
- Kyste hydatique.
- Ascaris*.
- Trypanosome.
- Histoplasma capsulatum*.

Ces antigènes ont été préparés selon la méthode décrite par Coudert (10) : les corps parasitaires sont prélevés vivants, soit rejetés par l'homme à la suite d'un traitement altérant peu leur vitalité (*tænia* ; *ascaris*), soit retirés des organes de l'animal récemment abattu (douve ; kyste hydatique). Les corps parasitaires sont immédiatement lavés au sérum physiologique stérile à plusieurs reprises, débarrassés soigneusement de toutes particules étrangères, restes de tissus de l'hôte en particulier. Onessore sur papier-filtre stérile, on fragmente grossièrement les parasites à l'aide d'instruments stériles et l'on place les fragments en couche mince dans des boîtes de Petri stériles, placées ensuite à l'étuve à 37° C., le couvercle légèrement soulevé. La dessiccation doit être rapide, complète en 24 heures.

Le produit brut desséché est broyé au mortier stérile et peut être stocké, en petits flacons stériles, entièrement remplis et hermétiquement bouchés. La conservation est excellente à l'abri de l'air et de la lumière.

La préparation de l'antigène se fait par extraction aqueuse à basse température. Nous utilisons habituellement la poudre stock à la dose de 1/100, en l'épuisant par le sérum physiologique à 8,5/1000, pendant 24 heures à la température de 4° C. en agitant à plusieurs reprises.

La macération est ensuite décantée et filtrée sur filtré de Seitz. La lyophilisation proprement dite doit alors être pratiquée dans le plus court délai et, en attendant, l'antigène est conservé à 4° C. ; si ce délai doit être plus long il est préférable de conserver le filtrat sous congélation au-dessous de — 20° C.

L'extrait parasitaire est alors réparti en ampoules, à raison de 1 cc. par ampoule, et après lyophilisation, ces ampoules sont fermées sous vide ou sous azote.

Les ampoules ainsi préparées peuvent se conserver indéfiniment, à la température ordinaire.

Au moment de l'utilisation, l'antigène se prépare extemporanément en redissolvant le contenu de l'ampoule dans 1 cc. d'eau bidistillée stérile; à partir de la solution ainsi obtenue, considérée comme solution mère, nous faisons des dilutions par dédoublement dans du sérum physiologique.

2. **Quant aux antigènes liquides** préparés au laboratoire, ce sont les suivants :

a) **Antigène hydatique.** Nous avons utilisé, avec des succès variés, des antigènes d'origine différente :

— soit liquide hydatique provenant de kystes parasitant des organes animaux ou humains ; le liquide recueilli est filtré sur papier-filtre stérile puis mis en ampoules et conservé à la glacière,

— soit extrait de membrane hydatique, formolé ou non et conservé à la glacière.

b) **Antigène de Tænia.** Extrait sec stérile de tænia repris par du sérum physiologique et mis en ampoules aseptiquement ; conservé à la glacière.

c) **Antigène d'anguillule.** Des selles de malade porteur d'anguillules sont mises en culture ; après quelques jours, on recueille le liquide entourant la coproculture et dans lequel sont les larves d'anguillules. Ce liquide est centrifugé, et le culot de centrifugation est lavé plusieurs fois au sérum physiologique ; lorsque les larves ont été ainsi lavées, elles sont mises en suspension dans du sérum physiologique de façon à ce qu'il y ait environ 300 larves par goutte de suspension.

Le liquide ainsi obtenu est congelé et décongelé plusieurs fois ; on obtient ainsi une suspension trouble qui est conservée au réfrigérateur à -70° C. et qui sert d'antigène.

d) **Antigène histoplasmine.**

On cultive sur milieu de Long (*) des souches d'*Histoplasma capsulatum* et d'*Histoplasma Duboisii*. Après trois mois pour l'*Histoplasma Duboisii* et six mois pour *Histoplasma capsulatum*, le milieu de culture est devenu brun acajou et le champignon a poussé en gros flocons surnageants, on recueille alors le milieu de Long et on le filtre. Le liquide ainsi obtenu est mis en ampoules et nous sert d'antigène pur, à partir duquel nous faisons des dilutions plus ou moins poussées.

(*) Préparation du milieu de Long.

Milieu synthétique de Long modifié :

1^{re} Formule :

1. Asparagine	5 gr.
2. Citrate d'Ammonium.....	5 gr.
3. Phosphate monopotassique.....	3 gr.
4. Carbonate de Sodium anhydre.....	3 gr.
5. Chlorure de Sodium.....	3 gr.
6. Sulfate de Magnésie cristallisée.....	1 gr.
7. Citrate de Fer ammoniacal.....	0,05
8. Glycérine	25 cc.
9. Eau distillée.....	900 cc.

2^o Préparation :

Dissoudre 2 et 3 chacun séparément dans 100 cc. d'eau en chauffant au besoin pour dissoudre entièrement.

Ajouter à 2, 4, 5 et 7, mélanger.

Ajouter 3, mélanger très intimement.

Ajouter 6, mélanger très intimement.

Ajouter la glycérine.

Amener le volume total à 900 cc. avec l'eau distillée.

Ajouter l'asparagine ; chauffer doucement pour dissoudre.

Ajuster à pH 7,2.

Stériser 15 minutes à l'autoclave à 120° C.

Après stérilisation, ajouter aseptiquement 10 gr. de dextrose dissous séparément dans 100 cc. d'eau distillée et stérilisée dix minutes à l'autoclave à 120° C.

e) Antigène toxoplasmique.

Cet antigène est préparé selon la méthode utilisée au laboratoire par Garin (20) et préparé à partir d'ascite de souris inoculées massivement cinq jours auparavant, par voie intra-péritonéale.

Cette préparation comporte les temps suivants :

1° Ponction et lavage des péritoines de souris avec du sérum physiologique stérile, à raison de 3 à 5 lavages de 2 cc. chacun par souris.

2° Centrifugation de la suspension ainsi obtenue pendant dix minutes à 4.000 tours/minute.

3° Reprise du culot avec du sérum physiologique stérile, remise en suspension par agitation douce avec un agitateur en verre ; nouvelle centrifugation. Au total, lavage 5 fois de suite, par centrifugations de la suspension de Toxoplasmes.

4° Remise du culot en suspension dans le sérum physiologique, à raison de 0,5 cc. de sérum physiologique par souris.

5° Congélations rapides de la suspension lavée, dans un mélange de carbo-glace-alcool, et dégels au bain-marie tiède ; ceci 5 fois de suite.

6° Ajouter à cette suspension du sérum physiologique phénolisé à 0,4 %, à raison de 0,5 cc. par souris.

7° Laisser mûrir à la glacière à + 4° C. pendant une semaine.

8° Centrifugation à 3.000 t/m pendant 10 minutes. Utiliser le liquide surnageant comme antigène.

9° Titrage de l'antigène en présence d'un sérum connu ; titre de référence : antigène de Westphal préparé industriellement par la "Farbwerke-Hoechst" à partir de l'exsudat péritonéal de cobaye.

Modifications : la préparation de l'antigène peut se faire, non pas par une succession rapide de congélations-dégels mais par éclatement des Toxoplasmes par les ultra-sons. Nous procédons de la façon suivante :

La suspension de Toxoplasmes lavés en sérum physiologique, est mise dans une boîte de Petri ; la tête de l'appareil à ultra-sons est placée immédiatement à la surface de cette suspension dans laquelle elle baigne de 1 millimètre environ. Le temps d'application des ultra-sons est d'environ 5 minutes ; le mieux est de vérifier toutes les minutes, au microscope à contraste de phase, l'aspect des toxoplasmes qui doivent être entièrement lysés quand on arrête l'application des ultra-sons.

Au laboratoire nous utilisons cependant plus volontiers les congélations et dégels successifs pour préparer notre antigène.

CHAPITRE III

TECHNIQUE DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION

1° Sensibilisation des particules de collodion par l'antigène.

Deux méthodes sont proposées par Cavelti :

a) Sensibilisation des particules par l'antigène et élimination subséquente de l'antigène non absorbé.

Dans cette méthode, l'antigène et les particules sont mélangés, le mélange est mis à incuber, puis les particules sont sédimentées par centrifugation et remises en suspension dans une solution saline (solution de ClNa à 9 pour 1000).

L'antigène, avec cette méthode, doit être utilisé à une concentration élevée ; Cannon et Marshall ont établi par exemple, en utilisant l'ovalbumine cristallisée, que la meilleure sensibilisation des particules était obtenue avec une solution d'ovalbumine à 5 %.

L'incubation peut se faire pendant une nuit au réfrigérateur ; dans d'autres cas, des résultats meilleurs sont obtenus par une incubation à température du laboratoire ou à l'étuve à 37° C.

En outre, dans leurs travaux, Cannon et Marshall, de même que Lowell, ont obtenu de meilleurs résultats en ajustant le pH de l'antigène le plus près possible de son point iso-électrique de façon à obtenir une meilleure absorption de cet antigène sur les particules.

Immédiatement avant l'usage, le mélange antigène-collodion incubé est centrifugé pendant 5 minutes à 2.500 t/m et le liquide surnageant est décanté aussi complètement que possible. La solution saline est ajoutée pour porter les particules à la concentration voulue et la suspension ainsi obtenue, vigoureusement agitée pour être rendue homogène, est ajoutée aux dilutions du sérum.

Au cours de notre travail au laboratoire de Parasitologie, nous n'avons pas utilisé cette méthode de sensibilisation mais la seconde décrite par Cavelti et qui est :

b) Le simple mélange.

Ce procédé a l'avantage d'une grande rapidité et généralement les réactions non spécifiques peuvent être contrôlées plus facilement que dans le procédé qui vient d'être décrit. Cependant, avec certains antigènes, on obtient parfois un titre de positivité moins élevé que lorsqu'on utilise des particules libres d'antigène non absorbé.

La meilleure façon de réaliser le mélange collodion-antigène dépend de la tendance que possède l'antigène à provoquer une agglutination non spécifique des particules de collodion. Si cette tendance est faible, le mieux est de diluer le collodion avec l'antigène non dilué et de diluer ensuite le mélange jusqu'à la densité finale. Si la tendance à l'agglutination non spécifique est considérable, il vaut mieux diluer l'antigène dans la solution saline avant d'ajouter la suspension de particules. C'est cette deuxième façon de procéder que nous avons utilisée le plus souvent pour notre travail au laboratoire.

Aussitôt que le mélange antigène-collodion est réalisé, il est agité vigoureusement pour être rendu homogène et après un délai de quelques minutes, il est ajouté aux dilutions de sérum. Nous avons essayé de porter ce délai à 30 minutes et même à une heure, mais nous n'avons jamais obtenu de meilleurs résultats que lorsqu'il est réduit à quelques minutes. De même, nous n'avons pas eu de résultats supérieurs en portant le mélange à l'étuve à 37° pendant la durée de l'incubation que lorsque nous laissons celle-ci se faire à la température du laboratoire.

2° Dilution de l'antigène.

Quelle que soit la méthode de sensibilisation utilisée, le choix d'une dilution optimum de l'antigène est de grande importance pour la réussite du test, comme l'ont montré Eisler et Cavelti. Si l'antigène est trop concentré il en résulte une suppression complète ou partielle de réaction visible ; une concentration trop faible pour sensibiliser les particules de collodion donne évidemment une réaction négative. La dilution optimum de l'antigène est déterminée en utilisant un ou plusieurs sérums positifs et en testant un certain nombre de séries identiques de ces sérums, à des dilutions progressives, avec des mélanges collodion-antigène dans lesquels les dilutions d'antigène sont progressivement croissantes.

La dilution d'antigène qui donne à la fois un titre élevé ainsi qu'une forte agglutination est prise comme type. Le plus haut titre ne coïncide d'ailleurs pas toujours avec la plus forte agglutination pour une dilution donnée de l'antigène ; de sorte qu'un compromis est parfois nécessaire.

Cette question de la recherche de la meilleure dilution des antigènes, ainsi d'ailleurs que de leur spécificité et de leur conservation, peut être considérée comme une application intéressante de la réaction d'agglutination des particules de collodion ; ce titrage des antigènes est un chapitre que nous aborderons plus loin.

3° Dilution des sérums.

Nous utilisons des sérums frais décomplémentés pendant 30 minutes à 60° C. quand il s'agit de sérums d'animaux, et 30 minutes à 56° C. pour les sérums humains. Nous avons fait plusieurs essais avec des sérums vieux de plus de 3 jours, parfois de plus de 3 semaines ; mais dans ces cas-là, nous n'avons jamais obtenu de réactions positives.

Les dilutions sont faites par dédoublement dans du sérum physiologique à partir de 1/10 jusqu'à 1/5120 ; nous n'avons jamais poussé plus loin nos dilutions et pour un certain nombre de sérums nous avons poussé les dilutions seulement jusqu'à 1/40 ou 1/80.

Nous avons remarqué en outre que certains sérums purs, ainsi que leurs dilutions inférieures à 1/10 donnent très souvent lieu à

des phénomènes d'agglutination non spécifique (agglutination des particules de collodion par le sérum seul en l'absence d'antigène); par contre, pour des dilutions supérieures à 1/10 nous n'avons jamais noté d'agglutination dans le tube témoin. Nous ne tenons donc plus compte actuellement, dans l'appréciation de nos résultats, tout au moins pour certains sérums, que des agglutinations apparues pour des dilutions égales ou supérieures à 1/10. D'autres sérums donnent à ces basses dilutions des réactions spécifiquement positives.

4° Conduite générale du test.

On utilise des tubes à sérologie de 11×100 m/m ; ces tubes sont numérotés pour qu'il n'y ait pas d'erreurs de répartition après la centrifugation finale.

Pour rendre aisée la lecture du résultat, le volume total de chaque tube doit être finalement de 0,5 à 0,7 cc. ; bien que dans la technique de certaines réactions sérologiques actuelles, on puisse utiliser un moindre volume. Les volumes respectifs des dilutions de sérum et du mélange antigène-collodion sont sensiblement égales ; 0,2 à 0,3 cc. Pour des raisons de commodité nous ne faisons pas la distribution en fractions de 1 cc. mais en gouttes, de la façon suivante :

	Tube R.	Tube témoin	Témoin antigène
	—	—	—
Collodion	3	3	3
Antigène	3	—	3
Sérum physiologique.....	—	3	4
	(incubation 3 à 5 minutes)		
Sérum immun.....	4	4	—

Ce qui donne au total 10 gouttes dans chaque tube, soit environ 0,5 cc.

Les tubes sont alors agités et mis à incuber à la température du laboratoire pendant une ou deux heures ; ils sont agités de temps en temps. L'incubation à l'étuve à 37° C. ne donne pas de meilleurs résultats.

Après incubation, les tubes sont centrifugés pendant 3 minutes à 1.400 t/m, et la lecture de l'agglutination se fait alors de la

façon suivante : les tubes sont placés devant un écran noir, au-dessus et en arrière duquel se trouve la source de lumière; ils sont vigoureusement agités et l'état d'agglutination est noté comme suit : dans l'agglutination + + + +, le diamètre des amas est de l'ordre de 1 à 1,5 m/m ou plus ; des amas plus petits sont notés + + + ; + + ; + ; la notation + désignant des amas très nettement visibles. Des particules juste à la limite de visibilité sont désignées par la notation $\pm$. Dans la négative, aucune particule n'est visible à l'œil nu, c'est-à-dire qu'après agitation on obtient une suspension homogène plus ou moins trouble, alors que dans les tubes présentant une réaction positive, le liquide surnageant, dans lequel les amas sont en suspension, est parfaitement limpide après agitation.

Selon Cavelti il serait parfois intéressant de faire une seconde lecture après que les tubes aient été laissés pendant une nuit au réfrigérateur, puis à nouveau centrifugés avant la lecture ; nous avons fait plusieurs fois cette seconde lecture après réfrigération sans jamais obtenir de meilleurs résultats.

Ceci concerne le test d'agglutination en tubes avec lecture macroscopique ; nous avons envisagé de faire des agglutinations sur lame avec agitateur de type Kline et lecture microscopique. Cette technique sera reprise au laboratoire, car n'ayant reçu l'agitateur qu'à la fin de notre expérimentation, nous n'avons pu faire qu'une seule réaction sur lame ; elle s'est d'ailleurs montrée négative.

En ce qui concerne la lecture microscopique, nous avons vu que Burger (3, 4), dans toute une série de réactions d'agglutination sur des systèmes protéine-antiprotéine, avait obtenu des titres d'agglutination plus élevés que par la simple lecture macroscopique. Pour quelques-unes des réactions que nous avons pratiquées, nous avons également constaté une certaine agglutination à la lecture microscopique alors que l'examen macroscopique était négatif; mais dans un très grand nombre de cas nous n'avons pas constaté de différence appréciable. La plupart des résultats que nous donnons dans les pages qui suivent ont été appréciés par lecture macroscopique.

DEUXIÈME PARTIE

RÉACTIONS D'AGGLUTINATION PRATIQUÉES AU LABORATOIRE RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons appliqué la réaction d'agglutination des particules de collodion au diagnostic d'un certain nombre de parasitoses ; chaque fois nous avons vérifié que cette réaction était applicable à la maladie parasitaire étudiée, en testant un certain nombre de sérums positifs ; dans la plupart des cas nous avons obtenu des résultats positifs.

En outre, nous avons appliqué cette réaction pour titrer la valeur de certains antigènes parasitaires, pour cela encore nous avons utilisé des sérums de malades dont l'affection ne faisait aucun doute (vérification par d'autres réactions sérologiques, contexte clinique, vérification chirurgicale). Pour chacune des maladies considérées, nous n'avons pu tester qu'un nombre restreint de sérums, ce qui enlève à ce travail toute valeur statistique.

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés sous forme de tableaux dans les pages qui suivent.

TITRAGE DES ANTIGÈNES

Nous avons fait quelques essais d'application de la réaction d'agglutination des particules de collodion au titrage de la valeur de certains antigènes.

1° Antigènes hydatiques.

Nous avons pris le sérum d'un malade porteur d'un kyste hydatique du foie opéré plusieurs fois pour récidives locales ; donc malade dont l'infestation hydatique ne faisait aucun doute.

Ce sérum donnait la plus forte agglutination des particules de collodion quand il était dilué au 1/20, l'antigène utilisé étant l'antigène humain lyophilisé. Nous avons pris cet antigène pour type et avons titré par comparaison un lot d'antigènes hydatiques de provenances diverses.

Les antigènes testés étaient les suivants :

- N° 1. Antigène liquide préparé à partir de liquide hydatique de porc et datant de 1942.
- N° 2. Antigène d'origine analogue, datant de 1953.
- N° 3. Antigène d'origine analogue, datant de 1955.
- N° 4. Antigène liquide préparé à partir de liquide hydatique humain, datant de 1948.
- N° 5. Antigène d'origine analogue, datant de 1950.
- N° 6. Antigène d'origine analogue, datant de 1951.
- N° 7. Antigène d'origine analogue, datant de 1954 (soit vieux de 3 mois au moment de l'expérience).
- N° 8. Antigène liquide préparé à partir de la membrane d'un kyste hydatique humain et datant de quelques mois.
- N° 9. Antigène d'origine analogue et formolé.
- N° 10. Antigène lyophilisé pris pour type.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Dilutions des antigènes

	1/2	1/4	1/8	1/16	Témoin antigène	Témoin sérum
N° 1	—	—	—	—	—	—
N° 2	—	—	+	—	—	—
N° 3	—	—	—	—	—	—
N° 4	—	—	+	—	—	—
N° 5	+	+	+	±	—	—
N° 6	—	—	±	—	—	—
N° 7	+++	+++	+++	++	—	—
N° 8	++	+	+	—	—	—
N° 9	—	+	++	±	—	—
N° 10	+	++	+++	++	—	—

Ce tableau nous montre que l'antigène donnant les plus fortes agglutinations est l'antigène N° 7 ; antigène **récent** d'origine humaine, il donne même un titre supérieur à celui donné par l'antigène lyophilisé. La plupart des autres antigènes ont une activité beaucoup plus réduite, voire même négative. Enfin ce tableau montre que la plupart de ces antigènes hydatiques donnent le titre le plus élevé d'agglutination quand ils sont dilués au 1/8 (soit, pour l'antigène lyophilisé : 1/800).

Après un délai de trois mois nous avons renouvelé partiellement cette expérience, pour voir si, après ce court vieillissement, l'antigène N° 7 n'avait pas perdu de ses propriétés. Nous l'avons testé dans les mêmes conditions que ci-dessus : par comparaison avec l'antigène humain lyophilisé dont la conservation est assurée, et sur un sérum dilué au 1/20.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dilutions des antigènes

	1/2	1/4	1/8	1/16	T. A.	T. S.
Antigène N° 7...	+	+	++	±	—	—
Antigène N° 10...	—	+	++	—	—	—

Ce qui nous montre qu'après trois mois cet antigène liquide donne un titre qui n'est guère plus élevé que celui donné par l'antigène lyophilisé pris pour type ; on peut donc en déduire que la conservation des antigènes liquides est bien moindre que celle des antigènes lyophilisés de même origine, et la réaction d'agglutination des particules de collodion nous semble être très intéressante pour tester cette conservation.

2° Antigènes histoplasmiques.

Nous avons fait une expérience analogue avec plusieurs antigènes histoplasmiques.

a) Antigènes liquides :

Antigène N° 1 : culture d'*Histoplasma capsulatum* récente.

Antigène N° 2 : culture d'*Histoplasma capsulatum* ancienne.

Sérum immun : sérum de cobaye inoculé plusieurs semaines auparavant avec la même souche d'*Histoplasma capsulatum*.

Le sérum était dilué au 1/10.

Dilutions de l'antigène

	1/2	1/10	1/100	T. A.	T. S.
	—	—	—	—	—
N° 1.....	++	+++	+++	—	—
N° 2.....	+	++	++	—	—

Nous voyons que l'antigène récent donne un titre plus élevé que l'antigène ancien.

Un mois et demi après nous avons fait une expérience analogue en utilisant :

b) Antigène liquide et antigène lyophilisé :

Antigène N° 1 : le même que précédemment.

Antigène N° 2 : antigène lyophilisé préparé à partir d'une culture d'*Histoplasma capsulatum*.

Sérum immun : sérum de cobaye inoculé avec *Histoplasma capsulatum*.

Dilutions du sérum

	1/2	1/10	1/100	1/1000	T. A.
	—	—	—	—	—
Dilutions de l'antigène liquide:	R T	R T	R T	R T	
1/1	— —	— —	— —	— —	—
1/10	— —	— —	— —	— —	—
1/100	— —	— —	— —	— —	—
Antigène lyophilisé employé					
au 1/100.....	+ +	++ —	++ —	± —	—

Il ressort de ce tableau que l'antigène liquide, donnant un mois et demi auparavant un titre d'agglutination élevé, ne possédait plus aucune propriété antigénique au moment de cette dernière expérience. Par contre, l'antigène lyophilisé donnait un résultat satisfaisant sauf pour la dilution du sérum à 1/2, dilution pour laquelle il s'est produit également une agglutination dans le tube témoin ; mais nous avons vu, dans le chapitre relatif aux dilutions de sérum, que cela se produisait parfois pour certains sérums à des dilutions inférieures à 1/10.

Nous avons alors fait un examen microscopique de cette culture d'*Histoplasma capsulatum* servant d'antigène liquide, et nous avons constaté qu'il s'était produit une contamination qui avait substitué un autre champignon à *Histoplasma capsulatum*. L'inoculation de ce liquide à un cobaye n'a pas donné lieu à l'apparition des lésions provoquées habituellement par *Histoplasma capsulatum*.

Dans ce cas encore, l'agglutination des particules de collodion nous semble une méthode facile pour tester la conservation des propriétés antigéniques.

TOXOPLASMOSE

Le premier essai d'agglutination des particules de collodion appliquée au diagnostic de la Toxoplasmose a été fait sur trois sérums de malades pour lesquels la déviation du complément avait été positive jusqu'à la dilution de 1/40. Nous avons utilisé le même antigène que pour la déviation du complément, aux dilutions de 1/1 ; 1/2 ; 1/3, les résultats ont été négatifs.

Cependant comme il s'agissait de sérums déjà vieux de plusieurs jours, nous n'avons pas tenu compte de ce résultat ; nous avons recommencé l'expérience avec un sérum frais, également positif au 1/40 à la déviation du complément, l'antigène ayant été utilisé pur et nous avons obtenu les résultats suivants :

	1/10	1/50	1/100	1/1000	1/2000	T. S.	T. A.
A	—	—	—	—	—	—	—
Lecture macroscopique	+++	+++	+++	±	—	—	—
Lecture microscopique	++++	++++	++++	++	+	—	—
B							
Lecture macroscopique	—	—	—	—	—	—	—
Lecture microscopique	+	+	+	±	±	—	—

Dilutions du sérum de 1/10 à 1/2000.

A. : 5 minutes d'incubation du mélange antigène-collodion avant l'adjonction des dilutions de sérum.

B. : 30 minutes d'incubation.

TS. : Témoin du sérum.

TA. : Témoin de l'antigène.

Ce tableau nous montre que :

1° L'agglutination des particules de collodion donne un titre au moins aussi élevé que la déviation du complément.

2° Avec ce sérum, la lecture microscopique donne un titre plus élevé que la lecture macroscopique.

3° Une incubation de courte durée est préférable à une longue incubation.

Avec un autre sérum, frais également, l'agglutination des particules de collodion a donné les mêmes résultats que la déviation du complément :

positif + + + + à la dilution de 1/10.

positif + à la dilution de 1/20.

négatif — à la dilution de 1/40.

Nous avons alord fait une expérience pour voir si la réaction d'agglutination des particules de collodion permettait de déceler, plus rapidement que la déviation du complément, la montée des anticorps toxoplasmiques dans des sérums de cobayes.

Nous avons pris un lot de 7 cobayes sensiblement identiques en taille et en poids.

Par ponction cardiaque, nous avons prélevé à chacun de ces cobayes 4 cc. de sang, afin de vérifier qu'aucun d'entre eux ne présentait spontanément d'anticorps toxoplasmiques. Les sérums ont été testés à la fois par la méthode de la déviation du complément et par la réaction d'agglutination des particules de collodion ; tous les sérums étaient négatifs.

Les animaux ont alors été inoculés avec une suspension de toxoplasmes vivants, recueillie par ponction péritonéale des souris sur lesquelles la souche de Toxoplasme est entretenue au laboratoire.

L'inoculation a été faite avec les doses suivantes :

Cobaye N° 1	10.000	Toxoplasmes	environ
— N° 2	10.000	—	—
— N° 3	10.000	—	—
— N° 4	1.000.000	—	—
— N° 5	1.000.000	—	—
— N° 6	1.000.000	—	—
— N° 7 (témoin)	0	—	—

Puis nous avons recueilli périodiquement du sang de ces animaux, par ponction cardiaque, de façon à tester la montée des anticorps ; les résultats sont indiqués sur le tableau suivant :

	Avant inoc.		7 ^e jour		14 ^e jour		33 ^e jour	
	DC.	Aggl.	DC.	Aggl.	DC.	Aggl.	DC.	Aggl.
N° 1	—	—	—	—				
N° 2	—	—	—	—	+	(1/40)	+	(1/320)
N° 3	—	—	—	—	+	(1/40)	+	(1/320)
N° 4	—	—	—	—				
N° 5	—	—	—	—	+	(1/40)	+	(1/320)
N° 6	—	—	—	—				
N° 7	—	—	—	—	—	—	—	—

Les cobayes N°s 1, 4 et 6 sont morts avant que les anticorps aient apparu dans leurs sérums ; les cobayes N°s 2, 3 et 7 sont morts après le trente-troisième jour, de sorte que nous avons dû arrêter l'expérimentation à ce moment-là. Nous pouvons donc seulement en déduire que la déviation du complément donne des réactions positives alors que l'agglutination des particules de collodion est encore négative.

NOTA. — Nous n'avons pu comparer, dans cette étude, l'agglutination des particules de collodion et le test de toxoplasmolyse ; au moment de ce travail nous ne disposions pas au laboratoire de « facteur accessoire » nous permettant de réaliser le test de lyse.

Commentaires.

Le fait que certains sérums de malades atteints de toxoplasmose aient donné une agglutination des particules de collodion à un titre comparable, voire parfois supérieur, à celui de la déviation du complément, permet de supposer que cette agglutination est une réaction sérologique applicable à la Toxoplasmose.

Par contre, il nous a semblé étonnant, le fait précédent étant acquis, qu'au moment où la déviation du complément était positive pour une dilution du sérum au 1/320, l'agglutination des particules de collodion soit encore négative. Peut-être les conditions de la réaction sont-elles encore à modifier, en ce qui concerne la Toxoplasmose expérimentale. Des travaux dans ce sens sont en cours au laboratoire de Parasitologie.

DISTOMATOSE

Pour tester les sérums de malades présentant une distomatose nous avons utilisé l'antigène lyophilisé ; chaque ampoule permettant, en dissolvant son contenu dans 1 cc. d'eau distillée stérile, d'obtenir extemporanément 1 cc. d'antigène liquide à la concentration de 1/100.

Le sérum utilisé pour tester cet antigène comme sensibilisateur des particules de collodion, était le sérum d'un malade ayant une éosinophilie à 9 % et dans les selles duquel la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* avait été notée à deux reprises.

Ce sérum a été dilué, par dédoublement dans du sérum physiologique, de 1/10 à 1/1280 et testé en regard des mêmes dilutions du sérum d'un sujet présumé sain. Par ailleurs l'antigène était également dilué dans du sérum physiologique, jusqu'au 1/800.

Nous avons pu voir ainsi que la meilleure dilution de l'antigène était 1/200. Avec cette dilution nous avons eu le résultat suivant :

Dilutions des sérums

	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	T. A.	T. S.
Sérum imm. . .	±	+	++	++	++	++	++	+	—	—
Sérum témoin.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Par la suite, nous avons testé les sérums suivants :

Sérum N° 1 : malade présentant une éosinophilie à 6 %, des œufs de Grande Douve dans les selles.
Début de l'affection non connu.

Sérum N° 2 : malade présentant une éosinophilie discrète à 3 %, un gros foie ; suspecté d'affection parasitaire, ce sérum a été testé avec différents antigènes.

Sérum N° 3 : malade suspect de distomatose, éosinophilie à 3 %. Une première réaction d'agglutination a été faite (3 a) sans qu'il ait été trouvé d'œufs de Douve dans les selles, et avant que l'intra-dermo-réaction n'ait été pratiquée.

Quelques semaines après, ce malade a évacué un Botriocéphale ; mais par la suite, des œufs de Douve ont été trouvés dans les selles de ce malade et l'intra-dermo-réaction pratiquée à ce moment a été positive. Nous avons alors pratiqué une seconde réaction d'agglutination (N° 3 b).

Sérum N° 4 : malade ayant évacué des œufs de Douve.

La recherche des éosinophiles sanguins n'a pas été pratiquée.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

	Dilutions des sérums									Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	T. A.	T. S.
N° 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N° 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N° 3 a ...	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—
N° 3 b ...	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	±	±	—	—
N° 4	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	+	—	—	—	—	—
Témoin ..	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Pour toutes ces agglutinations, l'antigène était utilisé dilué au 1/200.

Commentaires :

1° Tous les sérums de malades suspects de distomatose ont donné des agglutinations non spécifiques (agglutination des particules de collodion dans les tubes témoins) pour les dilutions inférieures à 1/10 ; par contre, pour les dilutions des sérums supérieures à 1/10 nous n'avons plus noté d'agglutination dans les tubes témoins.

2° Nous remarquons que la plus forte agglutination ne se produit pas toujours dans le tube contenant la plus faible dilution du sérum ; il semble exister un phénomène de zone pour ces faibles dilutions.

3° Dans les conditions de l'expérimentation : incubation du mélange antigène-collodion pendant 5 minutes à température du laboratoire, utilisation de sérums dilués au delà de 1/10, sensibilisation des particules de collodion avec un antigène distomien dilué au 1/200, il semble que l'agglutination des particules de collodion puisse être appliquée au diagnostic de la Distomatose.

TRYPANOSOMIASE

1° L'antigène utilisé est l'antigène lyophilisé ; le contenu de chaque ampoule, repris par 2 cc. d'eau distillée stérile, permet d'obtenir extemporanément un antigène au 1/100. Les dilutions de cet antigène à 1 % sont faites dans du sérum physiologique.

2° Les sérums immuns testés sont des sérums d'animaux de laboratoire (rats et souris) inoculés par voie intrapéritonéale avec 3/10 de cc. (pour les souris) et 8/10 de cc. (pour les rats) d'une suspension de Trypanosomes vivants ; la suspension de Trypanosomes utilisée est une culture de *Trypanosoma cruzi*, agent de la Maladie de Chagas, entretenus au laboratoire de Parasitologie sur milieu au sang.

La première expérience a été faite en utilisant le sérum d'un rat inoculé un mois auparavant ; les dilutions du sérum ont été poussées jusqu'à 1/100 et mises en présence des particules de collodion sensibilisées par des dilutions de l'antigène allant de 1/100 à 1/1000 ; aucune agglutination n'a été constatée.

Une deuxième expérience a été faite en utilisant le sérum d'une souris inoculée quatre mois auparavant et présentant des trypanosomes dans son sang périphérique le jour où le sang a été prélevé. Par cette expérience, nous avons titré l'antigène et nous avons vu que pour des dilutions du sérum allant de 1/10 à 1/80, le plus haut titre d'agglutination correspondait à l'antigène dilué au 1/200, puis nous avons poussé les dilutions du sérum et, utili-

sant l'antigène dilué, au 1/200, nous avons obtenu les résultats suivants :

	Dilutions du sérum							Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	T. A. T. S.
Témoin	++	++	+	+	+	+	±	—	—

Par la suite nous avons pu encore tester les trois sérums suivants :

Sérum N° 1 : sérum d'un rat inoculé six semaines auparavant.

Sérum N° 2 : sérum d'une souris inoculée un mois auparavant et présentant des trypanosomes dans son sang périphérique le jour où elle a été sacrifiée pour le prélèvement du sang.

Sérum N° 3 : sérum d'un rat inoculé deux mois auparavant.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

	Dilutions des sérums							Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	T. A. T. S.
N° 1.....	±	+	++	+++	+++	++	+	—	—
N° 2.....	+	+	++	+	—	—	—	—	—
N° 3.....	±	+	++	±	—	—	—	—	—
Témoin	—	—	—	—	—	—	—	—	—

3° Nous avons aussi testé un sérum humain ; il s'agissait du sérum d'une malade qui, présentant un néoplasme, avait eu une série de 12 injections d'extrait de Trypanosome.

L'antigène lyophilisé était utilisé au 1/200.

Les dilutions du sérum ont été poussées jusqu'au 1/5120.

Aucune agglutination n'a été constatée.

Commentaires.

En ce qui concerne la Trypanosomiase expérimentale du rat et de la souris, il semble, d'après ces résultats, que la réaction d'agglutination des particules de collodion soit d'un intérêt réel.

Quant à la Trypanosomiase humaine, d'autres recherches seraient nécessaires étant donné que la simple sensibilisation passive semble insuffisante pour donner lieu à une réaction d'agglutination positive.

ASCARIDIOSE

Les sérums qui ont été étudiés sont des sérums de malades ayant présenté un syndrome de Loeffler et ayant réagi à l'intra-dermo-réaction à l'Ascaridine (antigène ascaridien lyophilisé, repris par 1 cc. d'eau distillée).

L'antigène utilisé est ce même antigène lyophilisé, dont la mise en solution dans 1 cc. d'eau distillée réalise une concentration à 1 % à partir de laquelle nous faisons des dilutions progressives par dédoublement dans du sérum physiologique stérile.

Le premier sérum utilisé nous a permis de faire un titrage de cet antigène ; nous avons constaté alors que des dilutions élevées de l'antigène permettaient d'obtenir une agglutination alors que des dilutions moindre ne donnaient aucun résultat ; les meilleurs résultats ont été obtenus avec des dilutions de l'antigène allant de 1/1000 à 1/2000.

Nous avons alors testé un certain nombre de sérums en utilisant l'antigène dilué au 1/1000.

Sérums testés :

N° 1 : malade présentant une éosinophilie à 3 % et un gros foie, suspecté d'affection parasitaire; ce sérum a été testé avec plusieurs antigènes.

N° 2 : malade présentant une éosinophilie à 12 %, pas de syndrome de Loeffler.

N° 3 : malade ayant présenté un syndrome de Loeffler ; intra-dermo-réaction à l'ascaridine + + + +.

N° 4 : malade ayant réagi à l'intra-dermo-réaction à l'ascaridine (positif + +).

N° 4b: ce même sérum a été repris après une semaine de conservation à la glacière.

N° 5 : malade ayant présenté une réaction positive + + + à l'intra-dermo-réaction à l'ascaridine ; pas de syndrome de Loeffler.

N° 6 : malade ayant éliminé une femelle d'*Ascaris* dans ses selles.

Les résultats obtenus pour ces différents sérums sont rassemblés dans le tableau suivant :

	Dilutions des sérums							Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	T. A.	T. S.
N° 1.....	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N° 2.....	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N° 3.....	+	±	—	—	—	—	—	—	—
N° 4.....	+++	+++	+++	++	—	—	—		—
N° 4 b.....	±	+	±	±	—	—	—	—	+
N° 5.....	+	+++	++	++	+	+	—	—	—
N° 6.....	±	+	+	—	—	—	—	—	—
Témoin	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Commentaires.

La réaction semble intéressante et utilisable au moins à partir d'un certain degré d'infection par les *Ascaris*, mais elle semble manquer toutefois d'un certain degré de sensibilité.

ANGUILLULOSE

L'antigène utilisé est une suspension obtenue à partir de larves d'anguilles lavées plusieurs fois dans du sérum physiologique puis congelées et dégelées plusieurs fois. Cette suspension contient environ 300 larves par goutte.

Les sérums immuns testés sont des sérums de malades ayant évacué des larves dans leurs selles. Nous avons pu tester seulement 4 sérums.

Sur ces 4 sérums nous avons essayé différentes dilutions de l'antigène et nous avons obtenu des agglutinations (pas toujours spécifiques d'ailleurs) uniquement dans les séries où l'antigène n'était pas dilué. En outre, toutes les dilutions des sérums inférieures à 1/10 ont donné lieu à des agglutinations non spécifiques (agglutination dans le tube témoin).

Le tableau ci-dessous rassemble nos résultats.

	Dilutions des sérums			Témoins	
	1/5	1/20	1/40	T. A.	T. S.
N° 1.....	—	—	—	—	—
N° 2.....	±	±	—	—	—
N° 3.....	++	++	+	—	±
N° 4.....	+++	+++	+++	—	±
N° 5.....	+++	+++	+++	—	—

Commentaires.

En ne tenant pas compte du fait que les agglutinations obtenues avec les sérums dilués au 1/5 ne sont pas spécifiques (ce qui se produit pour un grand nombre d'autres sérums), il n'en reste pas moins que seules les réactions N^{os} 1 et 4 peuvent avoir une signification. On peut donc en conclure que cette réaction n'est pas adaptée au diagnostic de l'anguillulose, ou plutôt, peut-être, que l'antigène utilisé ne convient pas. Il se peut, en effet, que cet antigène liquide ne soit pas assez concentré ou que son mode de préparation et de conservation par le froid lui enlève toute propriété antigénique spécifique.

AFFECTIONS DUES AUX CESTODES

Nous avons groupé dans ce chapitre les réactions d'agglutination pratiquées avec des sérums de malades porteurs des plathelminthes suivants :

Tænia saginata,
Botriocéphale,

ainsi que des sérums de malades porteurs d'un kyste hydatique (larve du *Tænia échinocoque*).

La preuve de l'affection due à ces différents parasites est faite lorsque l'on a constaté l'élimination, dans les selles des malades :

d'anneaux de *Tænia saginata*,
d'œufs de *Botriocéphale*,

et pour les porteurs d'un kyste hydatique, lorsque

l'intra-dermo-réaction de Casoni est positive ou mieux (car la réaction de Casoni n'a qu'une spécificité de groupe), lorsque la présence du kyste hydatique relève du contexte clinique et mieux encore lorsqu'elle a été prouvée lors d'une intervention chirurgicale.

Les antigènes utilisés pour ces réactions d'agglutination sont des antigènes lyophilisés (*Tænia* et kyste hydatique) ainsi que des antigènes hydatiques liquides préparés au laboratoire : antigènes dont la valeur a été testée auparavant (cf. Chapitre relatif au titrage des antigènes).

Si nous avons groupé ces différentes réactions d'agglutination, c'est parce que, aussi souvent que nous l'avons pu, nous avons fait des réactions croisées, dans le but de vérifier si l'agglutination des particules de collodion permet de dissocier, mieux que ne le fait la réaction de Casoni, ces différentes parasitoses.

Le premier sérum testé, sérum d'un malade porteur d'un kyste hydatique, nous a servi à titrer notre antigène lyophilisé. Nous avons testé en parallèle la valeur d'un de nos antigènes liquides (cf. Chapitre Titrage des antigènes, ant. N° 6).

La meilleure dilution de l'antigène lyophilisé s'est révélée être la dilution au 1/400 ; l'antigène liquide n'a donné lieu qu'à des agglutinations non spécifiques.

Nous avons par la suite testé les sérums suivants :

Sérum N° 1 : sérum d'un malade ayant éliminé un *Tænia saginata* quelques jours avant la prise de sang.

Ce sérum nous a servi à titrer l'antigène lyophilisé de *tænia* ; nous avons obtenu des agglutinations identiques avec les dilutions au 1/100 et au 1/200. Nous avons alors mis ce sérum en contact avec des particules de collodion sensibilisées avec de l'antigène hydatique lyophilisé dilué au 1/200 et au 1/400 ; nous avons obtenu les résultats rassemblés dans le tableau suivant :

	Dilutions de sérum			Témoins	
	1/10	1/20	1/40	T. A.	T. S.
Antigène de tænia.....	—	—	—	—	—
Antigène hydatique.....	±	++	+	—	—
	+	+++	+	—	—

Sérum N° 2 : sérum d'un malade porteur d'un kyste hydatique ; réaction de Casoni positive, vérification chirurgicale.

Ce sérum a été testé avec les deux antigènes (tænia et kyste hydatique ; les résultats suivants ont été observés :

	Dilutions de sérum			Témoins	
	1/10	1/20	1/40	T. A.	T. S.
Antigène hydatique.....	—	—	—	—	—
Antigène de tænia.....	+++	++	++	—	—
	—	—	—	—	—

Sérum N° 3 : sérum d'un malade présentant une éosinophilie à 3 % et un gros foie ; suspecté de parasitose. Ce sérum a été testé avec plusieurs antigènes et, dans le groupe qui nous intéresse ici, avec les antigènes de tænia et de kyste hydatique.

	Dilutions de sérum					Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	T. A.	T. S.
Antigène tænia..	—	—	—	—	—	—	—
Ant. kyste hydat.	—	—	—	—	—	—	—

Sérum N° 4 : sérum d'un malade ayant éliminé un botriocéphale, testé en présence des antigènes de tænia et de kyste hydatique.

	Dilutions de sérum				Témoins	
	1/10	1/20	1/40		T. A.	T. S.
Antigène de tænia.....	—	—	—		—	—
Antig. de kyste hydatique.	—	—	—		—	—

Sérum N° 5 : sérum d'une malade ayant un kyste hydatique ; testé en présence d'antigène lyophilisé et d'antigène hydatique liquide récent (cf. le chapitre Titration des antigènes : ant. N° 7).

	Dilutions de sérum				Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	T. A.	T. S.
Antigène liquide..	—	—	—	—	—	—
Antig. lyophilisé..	++	+++	++	++	—	—
	++	++	++	+	—	—

Sérum N° 6 : sérum d'un malade ayant éliminé un *tænia saginata* quelques jours après la prise de sang (présence depuis quelque temps d'anneaux de *tænia* dans les selles).

Testé en présence des antigènes lyophilisés de *tænia* et de kyste hydatique.

Sérum N° 6b : En outre, le malade, qui n'a plus éliminé d'anneaux par la suite, nous a donné du sang 1 mois 1/2 après ; ce nouveau sérum a été testé uniquement avec de l'antigène de *tænia*.

	Dilutions des sérums			Témoins	
	1/10	1/20	1/40	T. A.	T. S.
N° 6 :	—	—	—	—	—
Ant. kyste hydat..	++	+++	+++	—	—
Ant. <i>tænia</i>	++	++++	++++	—	—
N° 6b :					
Ant. <i>tænia</i>	—	—	—	—	—

Nous nous sommes cependant demandé si le fait que cette dernière réaction soit négative était dû à une chute des anticorps ou au vieillissement de la suspension de particules de collodion ; celle-ci était préparée, en effet, depuis plus de trois mois. N'ayant pas revu le malade, nous n'avons pas pu faire une nouvelle vérification avec une suspension récente.

Sérum N° 7 : sérum d'une malade présentant un kyste hydatique, testé en présence d'antigène hydatique récent non lyophilisé (ant. N° 7) et d'antigène de *tænia*.

	Dilutions du sérum			Témoins	
	1/10	1/20	1/40	T. A.	-T. S.
Antigène de kyste hydatiq.	++	+++	+++	—	—
Antigène de <i>tænia</i>	—	—	—	—	—

Nous avons essayé, avec ce sérum, de réaliser la réaction d'agglutination des particules de collodion sur lame en utilisant un agitateur type Kline. Dans chaque cupule de la lame nous avons mis une goutte de chaque dilution du sérum, et une goutte du mélange collodion-antigène (nous avons utilisé l'antigène hydatique lyophilisé dilué au 1/400). Puis nous avons placé la lame sur l'agitateur et nous avons fait trois lectures microscopiques :

après 10 minutes d'agitation,
après 20 minutes d'agitation,
après 30 minutes d'agitation.

Aucune de ces lectures n'a permis de noter la moindre agglutination. Ceci se plaçant à la fin de notre expérimentation, nous n'avons pas pu faire de nouveaux essais d'agglutination avec agitateur ; cette méthode sera reprise au laboratoire.

Commentaires.

De ces quelques réactions d'agglutination, il semble que l'on puisse tirer les remarques suivantes :

1° Aucune agglutination n'ayant été notée dans les tubes témoins, cette réaction sérologique doit pouvoir s'appliquer au diagnostic de la présence du *Tænia saginata* et d'un kyste hydatique.

2° On ne peut rien conclure en ce qui concerne son application au diagnostic de la présence d'un *Botriocéphale*.

3° L'utilisation simultanée des deux antigènes lyophilisés de *tænia* et de kyste hydatique peut permettre le diagnostic différentiel entre la présence d'un *Tænia* et celle d'un Kyste hydatique. On pourrait voir là une spécificité supérieure à celle de l'intra-dermo-réaction de Casoni.

HISTOPLASMOSE

Comme l'ont montré Saslaw et Campbell, la réaction d'agglutination des particules de collodion semble parfaitement adaptée au diagnostic de l'Histoplasmose quand on utilise des sérums d'animaux de laboratoire (lapins ou cobayes). Différents lots d'Histoplasmine ont été testés en présence de sérums de lapins immunisés ; ces différents antigènes histoplasmiques ont donné des agglutinations positives, pour des dilutions de sérum allant jusqu'à 1/160 et parfois 1/320, quand on les a utilisés à des dilutions optimales allant de 1/100 à 1/300. En outre, des réactions croisées mettant en présence des sérums de lapins, inoculés avec différentes levures pathogènes, et des particules de collodion sensibilisées avec d'une part de l'histoplasmine, d'autre part de la blastomycine, ont montré que les agglutinations obtenues étaient très spécifiques avec l'histoplasmine et un peu moins avec la blastomycine (35). Ces deux auteurs ont, en outre, montré par une autre série d'expériences (34), en utilisant encore des sérums de lapins immunisés, que les meilleurs résultats étaient obtenus en laissant l'incubation du mélange collodion-antigène se faire à température du laboratoire ; alors que des incubations à 37° C. ou à 52° C. ont donné des agglutinations bien moins importantes, voire une absence d'agglutination. Dans cette même expérience, ils ont observé qu'en laissant la réaction se poursuivre pendant une nuit au réfrigérateur, de nombreux sérums normaux ou hétérologues donnaient lieu à des réactions non spécifiques, alors que pour les sérums spécifiques l'agglutination atteignait un titre beaucoup plus élevé.

Par contre, par une autre série d'expériences, Saslaw et Campbell (36), testant des sérums humains avec l'antigène histoplasmique, ont obtenu les résultats suivants :

1° La corrélation entre le test cutané à l'histoplasmine et l'agglutination des particules de collodion semble être masquée par des réactions non spécifiques :

Expérience portant sur 197 sérums de sujets d'origine différente :

71 de ces sujets ont réagi à l'intra-dermo-réaction, et seulement 25 sérums ont donné des agglutinations positives spécifiques.

126 sujets n'ont pas réagi à l'intra-dermo-réaction alors que 35 sérums seulement n'ont pas agglutiné les particules de collodion.

Tous les autres sérums, soit 137 ont donné lieu à des agglutinations non spécifiques.

De même, 32,3 % de 236 sérums de sujets apparemment sains, et n'ayant pas subi d'intra-dermo-réaction, ont donné lieu à des agglutinations non spécifiques.

2° Etudiant les sérums de 6 malades ayant une Histoplasmose, ces deux auteurs ont obtenu des résultats parallèles entre agglutination des particules de collodion et fixation du complément, bien que cette dernière réaction ait donné des titres plus élevés. Dans les deux cas, les titres étaient beaucoup plus élevés pour les sérums des trois sujets en phase aiguë de la maladie que pour ceux des trois autres, qui présentaient une Histoplasmose chronique.

Au laboratoire, nous avons pratiqué quelques réactions d'agglutination avec des sérums de cobayes inoculés quelques semaines auparavant avec la phase levure d'*Histoplasma capsulatum* et d'*Histoplasma duboisii* ; nous avons également pu tester le sérum d'un malade atteint d'Histoplasmose.

Les antigènes utilisés étaient d'une part de l'histoplasmine *capsulatum* lyophilisée et d'autre part des histoplasmines liquides (*capsulatum* et *duboisii*).

La première expérience faite sur des sérums de cobayes nous a permis de voir que la meilleure dilution des antigènes utilisés était 1/100 ; cependant les dilutions des sérums n'ont pas été assez poussées pour que nous puissions juger de l'action spécifique de chaque antigène mis en présence de sérums homologues ou non. Quand nous avons voulu pousser plus loin les dilutions, les sérums étant trop vieux, nous n'avons obtenu que des réactions non spécifiques.

La deuxième expérience, utilisant un sérum de malade, a donné les résultats suivants.

Antigènes dilués au 1/100 :

	Dilutions de sérum					Témoins	
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	T. A.	T. S.
Ant. capsul.	+++	+++	+++	++	++	—	—
Ant. duboisi.	++	++	++	+++	+	—	—

Nous avons également testé un autre sérum de malade suspect d'histoplasmosse, mais utilisant une suspension de particules de collodion vieille de plus de trois mois, nous n'avons obtenu que des réactions non spécifiques.

Enfin, nous avons repris la première expérience avec de nouveaux cobayes et avons obtenu les résultats ci-dessous :

Dilutions des antigènes	Sérum capsulatum Dilutions de sérum					Sérum duboisi Dilutions de sérum				
	1/2	1/10	1/100	1/1000	T. S.	1/2	1/10	1/100	1/1000	T. S. T. A.
A										
1/1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B										
1/1	±	++++	+	—	—	±	++++	+++	±	—
1/10	—	—	—	—	—	—	—	±	±	—
1/100	—	—	—	—	—	—	—	±	±	—
C										
1/100	+	++	++	±	—	±	±	—	—	—

A : antigène liquide d'histoplasma capsulatum.

B : antigène liquide d'histoplasma duboisi.

C : antigène lyophilisé d'histoplasma capsulatum.

L'antigène liquide d'histoplasma capsulatum s'est révélé à ce moment dénué de toutes propriétés, la culture ayant été contaminée (cf. Chapitre : Titrage des antigènes).

L'antigène liquide d'histoplasma duboisi a perdu de ses propriétés, puisque 1 mois 1/2 auparavant sa dilution optimale était 1/100 (première expérience) ; mais, par contre, ce tableau montre qu'il a conservé une certaine spécificité.

L'antigène lyophilisé, enfin, montre également une certaine spécificité vis-à-vis du sérum homologue.

Commentaires.

Comme l'ont montré Saslaw et Campbell, l'agglutination des particules de collodion est applicable au diagnostic de l'Histoplasmose, tout au moins en ce qui concerne la maladie animale expérimentale, avec une certaine réserve pour la maladie humaine.

Elle peut permettre de séparer l'Histoplasmose américaine de l'Histoplasmose africaine à *Histoplasma duboisii*, sous réserve qu'il semble exister une partie antigénique commune aux deux, alors qu'une partie antigénique de l'Histoplasmose africaine ne se retrouve pas dans l'Histoplasmose américaine.

Enfin, dans ce cas encore, l'antigène lyophilisé possède une supériorité certaine sur les antigènes liquides préparés au laboratoire et dont la conservation est très limitée.

CONCLUSIONS

I. — La réaction d'agglutination des particules de collodion présente l'intérêt d'être une réaction polyvalente puisqu'on peut la sensibiliser par le moyen de différents antigènes.

II. — Les antigènes utilisables doivent répondre dans chaque cas à des conditions bien précises de préparation et de conservation.

Nous avons utilisé des antigènes lyophilisés préparés à partir des parasites suivants : Douve ; Ascaris ; Tænia ; Trypanosome ; Kyste hydatique ; Histoplasma capsulatum. Ces antigènes nous ont donné des résultats plus intéressants que les antigènes liquides de : Tænia ; Kyste hydatique ; Histoplasma capsulatum et duboisi ; Anguillule ; Toxoplasme.

III. — La réaction est utilisable pour le titrage des antigènes, en présence d'un sérum témoin de malade ou d'animal. Ce titrage s'est montré intéressant pour le liquide de kyste hydatique conservé en ampoules ainsi que pour l'Histoplasmine liquide.

IV. — Dans un but de diagnostic, la réaction s'est avérée intéressante pour les maladies suivantes : Distomatose ; Trypanoso-

miase ; affections dues aux Cestodes ; Histoplasmoses, mais à un degré moindre pour la Toxoplasmoses, l'Ascariidose et l'Anguillulose.

Des réserves sont encore nécessaires, non pas vis-à-vis de sa spécificité mais vis-à-vis de sa sensibilité.

V. — Pour cette réaction d'agglutination, les sérums doivent dans tous les cas être utilisés frais.

Le Doyen,
H. HERMANN.

Le Président de la Thèse,
Ch. GARIN.

Vu et permis d'imprimer,
Lyon, le 19 Octobre 1955

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
André ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

1. BEDSON S.P. — Simple method for determining electrical charge carried by virus particles. *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 364, 1929.
2. BERGER F.M. — Agglutination test for serological diagnostic of syphilis. *J. Path. Bact.*, **55**, 363, 1943.
3. BURGER M. — Microscopic observation of collodion particles as indicators of type-specific pneumococcic immune reactions. *J. Lab. Clin. Med.*, **28**, 1128, 1943.
4. — Microscopic observation of collodion particles agglutination in protein-antiprotein systems. *J. Lab. Clin. Med.*, **29**, 352, 1944.
5. CANNON P.R. and MARSHALL C.E. — Studies on mechanism of Arthus phenomenon. *J. of Immunology*, **38**, 365, 1940.
6. — Improved serologic method for determination of precipitative titers of antisera. *J. of Immunology*, **40**, 127, 1941.
7. CAVELT, P.A. — Studies on technic of collodion agglutination; influence of certain qualities of collodion particles and of proportions of antigen and collodion on sensitivity and specificity of reaction. *J. of Immunology*, **49**, 365, 1944.
8. — The technic of collodion particles agglutination. *J. of Immunology*, **57**, 141, 1947.
9. CHASE J.H. — Serological and immunological studies on gonadotrophic hormones. *Yale J. Biol. Med.*, **17**, 517, 1945.
10. COUDERT J. — Antigènes lyophilisés en parasitologie. *La Presse Médicale*, **63**, 1080, 1955.
11. DELVES E. — Immunological studies with purified serum bearing on unitarian theory of antibodies. *J. of Inf. Dis.*, **60**, 55, 1937.
12. DULANEY A.D., ALDEN R.H., CONGER R.P. — The preparation and biological activity of alpha-oestradiol sensitized collodion particles. *Proced. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 466, 1950.
13. EISLER D.M. — Influence of collodion particles on visible end-point in antibody titration. *J. of Immunology*, **42**, 405, 1941.

14. FREUND J. — ... *Am. Rev. of Tub.*, **12**, 124, 1925.
15. — Toxin-antitoxin reactions on surface of collodion particles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **28**, 65, 1930.
16. — On nature of toxin-antitoxin neutralization studied on collodion particles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **28**, 1010, 1931.
17. — On mechanism of toxin-antitoxin reactions. *J. of Immunology*, **21**, 127, 1931.
18. — Toxin-antitoxin reaction without neutralization. *J. of Exp. Med.*, **55**, 181, 1932.
19. — A method for Immunization with Carbohydrates haptenes absorbed on collodion particles. *Science*, **75**, 418, 1932.
20. GARIN J.P. — *Etude du Toxoplasme et de la Toxoplasmosé Humaine acquise*. Thèse, Lyon, 1953.
21. GOODNER K. — Collodion fixation, new immunological reaction. *Science*, **94**, 241, 1941.
22. HAVENS J.R., LLOYD H. — A method of preparing collodion particles for serological agglutination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**, 98, 1949.
23. HAVENS J.W.P., EICHMAN H.L. — Collodion particles agglutination with acute phase serums and immune globulin in viral hepatitis. *J. of Immunology*, **64**, 349, 1950.
24. JONES F.S. — Agglutination by precipitin. *J. of Exp. Med.*, **46**, 303, 1927.
25. JONES F.S. — Agglutination by precipitin. *J. of Exp. Med.*, **48**, 183, 1928.
26. LANGE K., GOLD M.M.A., WEINER D., SIMON V. — ... *J. of Clin. Investig.*, **28**, 80, 1944.
27. LOEB J.J. — The influence of electrolytes on the cataphoretic charge of colloidal particles and the stability of their suspensions. *Experiments with collodion particles*. *Gen. Physiol.*, **5**, 109, 1922.
28. LOWELL F.C. — Comparison of collodion particles technic with other method of measuring antibody. *J. of Immunology*, **46**, 177, 1943.
29. MORRIS R.P. — Collodion agglutination test in Human Tuberculosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **50**, 170, 1943.
30. MUDD S. — Characterization of sensitized surface. *J. of Exp. Med.*, **52**, 313, 1930.
31. NEUZIL E. — Facteurs adjuvants dans la réaction antigène-anticorps. *Techniques de laboratoire Loiseleur*. J. Masson, édit., **1**, 851.

32. PEARSON H.E. — Attempts to obtain specific agglutination of mixtures of collodion particles or bacterial cells with virus and anti-viral serum. *J. of Immunology*, **49**, 117, 1944.
 33. RIORDAN J.T. — Collodion particles agglutinative test in detection of antigens derived from tubercle bacilli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **49**, 622, 1942.
 34. SASLAW S. and CAMPBELL C.C. — A method for demonstrating antibodies in rabbit sera against Histoplasmosis by the collodion agglutination technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**, 559, 1948.
 35. — A comparison between Histoplasmosis and Blastomycin by the collodion agglutination technique. *Public Health Reports*, **64**, 290, 1949.
 36. — A collodion agglutination test for histoplasmosis. *Public Health Reports*, **64**, 424, 1949.
 37. — Studies on the stability of the Histoplasmin collodion agglutination test. *J. of Labor. and Clin. Med.*, **35**, 780, 1950.
 38. WEIR J.M. — Technic for demonstrating antibodies against tuberculin in experimental animals with sensitized collodion pellets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**, 47, 1941.
 39. ZOZAYA J. — Carbohydrates absorbed on colloid as antigen. *J. of Exp. Med.*, **55**, 326, 1932.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
HISTORIQUE	15
PRÉPARATION DES PARTICULES DE COLLODION.....	19
PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.....	25
TECHNIQUE DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION.....	31
RÉSULTATS OBTENUS :	
TITRAGE DES ANTIGÈNES.....	37
TOXOPLASMOSE	41
DISTOMATOSE	44
TRYPANOSOMIASE	46
ASCARIDIOSE	48
ANGUILLULOSE	49
AFFECTIONS DUES AUX CESTODES.....	50
HISTOPLASMOSE	55
CONCLUSIONS	59
BIBLIOGRAPHIE	61
